

血清中のらい菌フェノール性糖脂質の 固相法による抽出と高速液体クロマト グラフィーによる定量

藤 原 剛*

Solid Phase Extraction of Phenolic Glycolipid of *Mycobacterium leprae* in Serum Samples and its Quantitative Analysis by HPLC

Tsuyoshi FUJIWARA

I. はじめに

1982年に Hunter ら¹⁾によってらい菌からフェノール性糖脂質 (PGL-I) が単離、構造決定されて以来その血清学的性質が多くの研究者によって研究されてきた。²⁻¹¹⁾特に糖鎖の化学合成が成功した事によって多数の血清試料について詳細に検討することが可能になった。その結果 PGL-I の糖鎖、特に三糖全体を合成し、血清アルブミン (BSA) に結合させた合成抗原 (NT-P-BSA)^{7,11)} が抗 PGL-I 抗体を定量することでらい菌の感染を血清学的に診断するための道具として、また治療中の患者に対する化学療法の効果のモニタリングの道具として極めて有用であることが明らかになり、¹²⁾ 現在ではこの合成抗原を用いた ELISA やゼラチン粒子凝集法が実用化されている。¹³⁾

しかし多くの患者のなかには血清中の抗体価と臨床症状とが必ずしも一致しない例が見受けられる。また抗 PGL-I 抗体の抗体価とその他の指標例えば菌指数 (BI) 等とは相関関係がほとんどない。¹⁴⁾ さらに化学療法の際には抗体価の低下よりもかなり早く PGL-I の量が低下するという報告もある。¹⁵⁾ 従って抗体価の定量と同時に抗原である PGL-I も定量する事が望ましい。

血清中の PGL-I を定量するにはなんらかの方法で PGL-I を抽出する事が必要で、主として凍結乾燥した血清からクロロホルム-メタノール混液で抽出している。定量は抽出物を塗布したセルロース膜を用いた DOT-ELISA によって行なっている。^{15,16)} しかしこの抽出法は非常に手間がかかり多数の検体を扱うには適当でないし抽出物が多くの爽雑物を含んでいて化学的な定量が難しい。また PGL-I の定量法である DOT-ELISA は完全な定量法とは言えず半定量である。本報告では多数の検体を扱うのに適した簡便な抽出法の検討と高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による PGL-I の定量について述べる。

II. 実験材料と方法

1. PGL-I

実験的にらい菌を感染したアルマジロの肝臓から Hunter らの方法¹⁷⁾によって抽出、

* 化学研究室 (平成元年9月27日受理)

精製した物をHPLCで最終的に精製した。純度は99%以上であった。

2. 血清

らい療養所から集めた患者血清25例(L, BL15例, BB3例, T, BT7例)および健康接触者6例で和泉眞蔵博士(国立多摩研究所)より分与された物である。

3. 血清中のPGL-Iの抽出

250 μ lの血清に同量の0.1MのNaOHを加えて2倍に希釈しエクストレルート1(1ml用)のカラムに添加する。さらに250 μ lの0.1MNaOHで2回洗い込む。15分後6mlのクロロホルムで脂質を溶出する。これを窒素で乾固し少量のクロロホルムに溶かしてフロリジルの小さなカラム(5X20mm, 100-200メッシュ)に添加する。クロロホルム(2ml)と5%アセトン-クロロホルム(5ml)で洗い5%メタノール-クロロホルム(6ml)でPGL-Iを溶出する。これを乾固し30 μ lの15%メタノール-クロロホルムに溶かし、25 μ lをHPLCに注入して定量する。HPLCの条件は次のとおりである。カラム：シリカゲル, Cosmosil 5SL; 4.6X150mm(ナカライテスクKK), 展開溶媒：1.5%メタノール-クロロホルム, 流速：1.0ml/min, 検出器：UV275nm。

III. 結果と考察

10 μ gのPGL-Iを含む健康者血清を250mlの水, 0.1MNaOH または0.1MHC1で2倍に希釈してエクストレルート1カラムに添加した。これをクロロホルムで抽出してHPLCで分析した。結果を図-1に示す。3種の希釈液を用いた場合の回収率は35-40%でどの場合でもあまり変わらなかったが, 0.1MNaOHを使用した場合HPLCでPGL-Iの近傍に溶出されるUV吸収ピークが小さく, 定量には好都合であったので以下の実験には0.1MNaOHを使用した。

次にエクストレルート1カラムからPGL-Iを抽出する際の溶媒を検討した。表-1に結果を示す。高い割合のアルコールを含む溶媒(エーテル-エタノール 8:2, エーテル-メタノール 3:1)はエマルジョンを与えるので分析には使えなかった。ヘキサ

表-1. 種々の溶媒によるエクストレルート1カラムからのPGL-Iの回収率

抽出溶媒	回収率(%)
クロロホルム-メタノール(9:1)	43.3
クロロホルム	42.3
エーテル	42.2
酢酸エチル	41.5
二塩化メチレン	35.4
クロロホルム-イソプロパノール(9:1)	32.8
ヘキサン	0
エーテル-エタノール(8:2)	*
エーテル-メタノール(3:1)	*

*エマルジョン

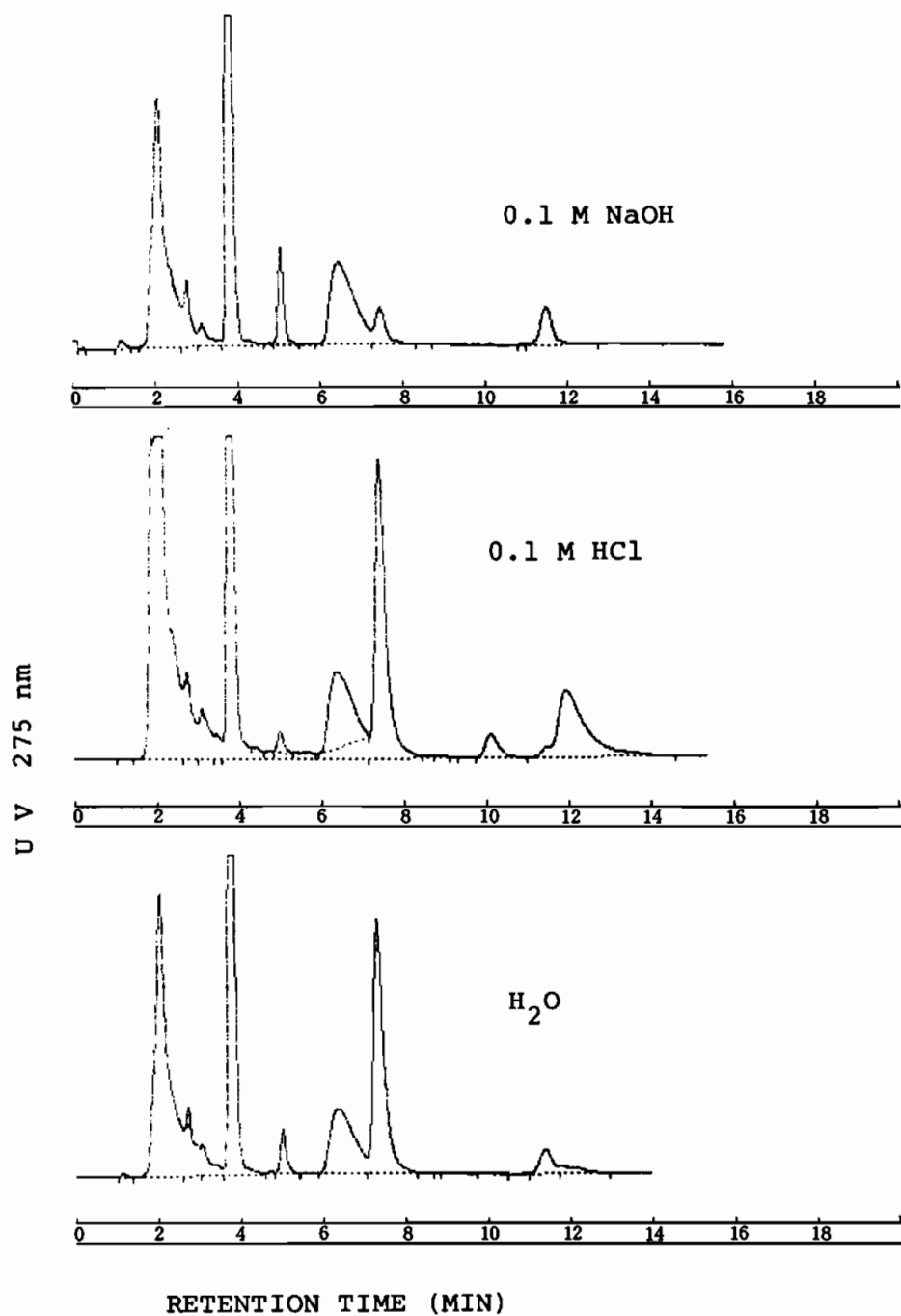


図-1 種々の血清希釈液を用いたPGL-Iの抽出

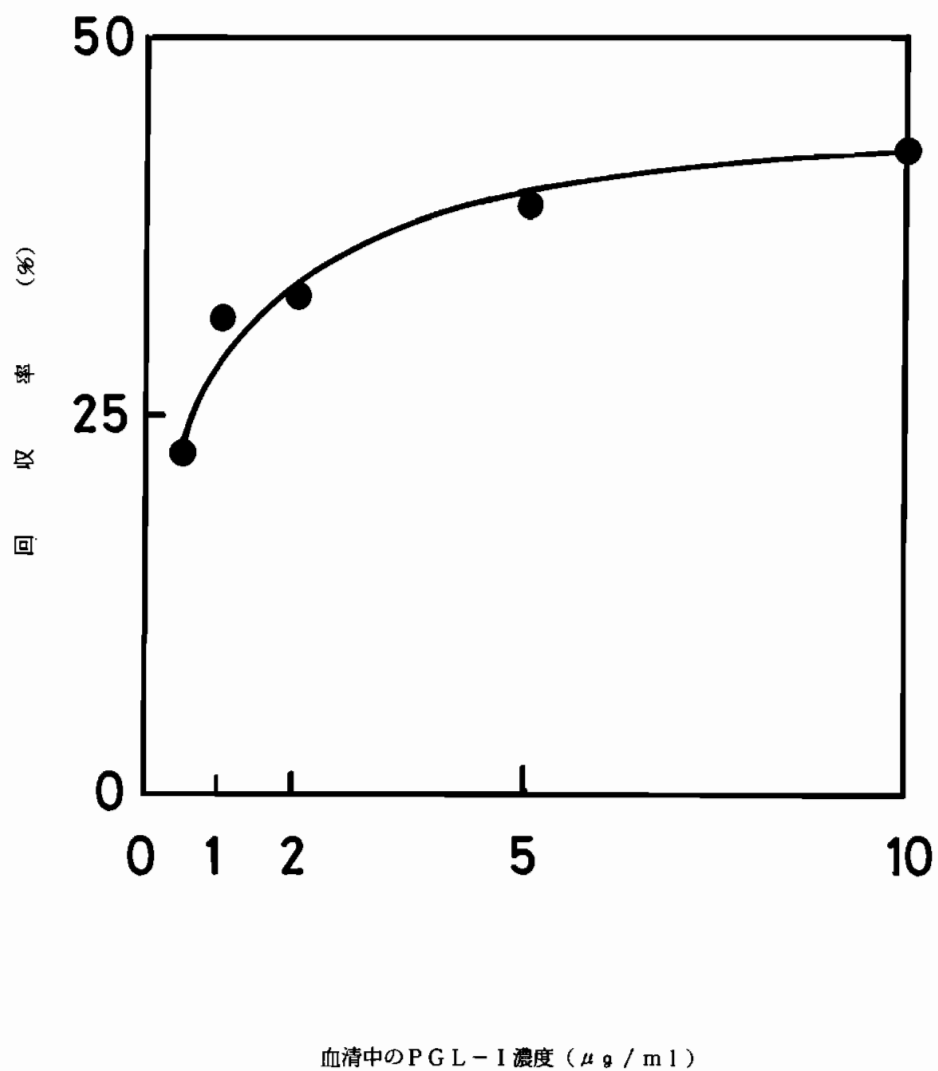


図-2 種々の濃度でのPGLの回収率

ンではPGL-Iは抽出されなかった。クロロホルム、エーテルまたはクロロホルム-メタノール 9:1を用いた場合の回収率は42-43%でかなり良い成績であった。このうちエーテルでは保持時間の長い物質の量は少なかった。しかしエーテルは沸点が低く危険でもあるので以後クロロホルムを使用することにした。

抽出に必要なクロロホルムの容積について検討した。4 mlでは全回収量の81.2%, 6 mlで95.1%, 8 mlで98.2%, 10 mlで99.5%であった。従ってPGL-Iの抽出には6 mlのクロロホルムで十分であった。

この抽出法のPGL-Iの回収率は10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のPGL-Iを含む血清試料の場合約42%であったが、これより低濃度の試料の場合の回収率について検討した。即ち健康者の血清にPGL-Iを10, 5, 2, 1, 0.5及び0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるようにPGL-Iを添加した試料を用いて抽出を行ないHPLCで定量して回収率を計算した(図-2)。回収率はPGL-I濃度が低くなるに連れて低下する傾向が認められ特に2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下ではその傾向が強く2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で35%, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で30%, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では23%であった。しかも低濃度では回収率のバラツキが大きかった。これはエクストレルート1カラムにはある一定量のPGL-Iが吸収され、溶出されなくなる事と0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下では検出されるPGL-IのピークがHPLCでは非常に低くなるためバックグラウンドのとり方で定量値が大きく変わるためと考えられる。これらの事を考えあわせるとこの方法の定量限界は0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度と考えられる。この値は実際の定量法として不十分で抽出条件をさらに詳しく検討する必要がある。

図-3に患者血清について行なったPGL-Iの定量の結果を示す。健康者血清(b)にはPGL-Iのピークは認められなかったがL(c)とBB(d)の血清にはPGL-Iのピークが明瞭に認められた。それぞれのPGL-I濃度は4.55 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (c), 3.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (d)である。15例の患者血清試料をプールの試料や12例の健康者血清について同様の定量を行なったが、PGL-Iに重なり合うピークは認められなかった。この定量法は改善の余地がまだ多いが多数の検体についてPGL-Iの定量を行なう方法として有用なものと考えられる。

多数の患者血清についてこの方法でPGL-Iの定量を行ない病型、病勢、抗PGL-I抗体の有無との相関について検討した(表-2)。PGL-Iの血清中の濃度の最大値は7.82 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でChoらの報告¹⁵⁾と一致する。病型との相関ではL+BLで7/15であるのに対してT+BTでは1/7で明らかにL+BLで高かった。これはBLもLも多歯型のらいであり当然の事と思われる。一方TもBTも寡菌型のらいで体内に存在するらい菌の数は非常に少なく従ってPGL-Iも少ないことを反映しているものと考えられる。しかし病勢とPGL-Iの濃度とは相関関係がなく活動期でも静止期でも約半分が陽性であるに止まった。抗PGL-I抗体の有無との関係では、L+BLでは抗体+の場合8/15が、抗体-の場合3/10がそれぞれ陽性となり抗体+の方にPGL-I陽性が多いことが分かった。しかし抗体-の血清でもPGL-I濃度の高い例もあり、その相関関係はそれ程高いとは考えられなかった。また健康接触者ではPGL-I陽性例は一例もなかった。

これらの結果からPGL-Iの濃度は血清によって大きく変わり1回の測定だけから結論をだすのはかなり難しいと思われるが、この測定法は簡便であるので経時的にPGL-I濃度をモニタリングする事によって病理的な状態を判断する手段になり得るものと思われる。

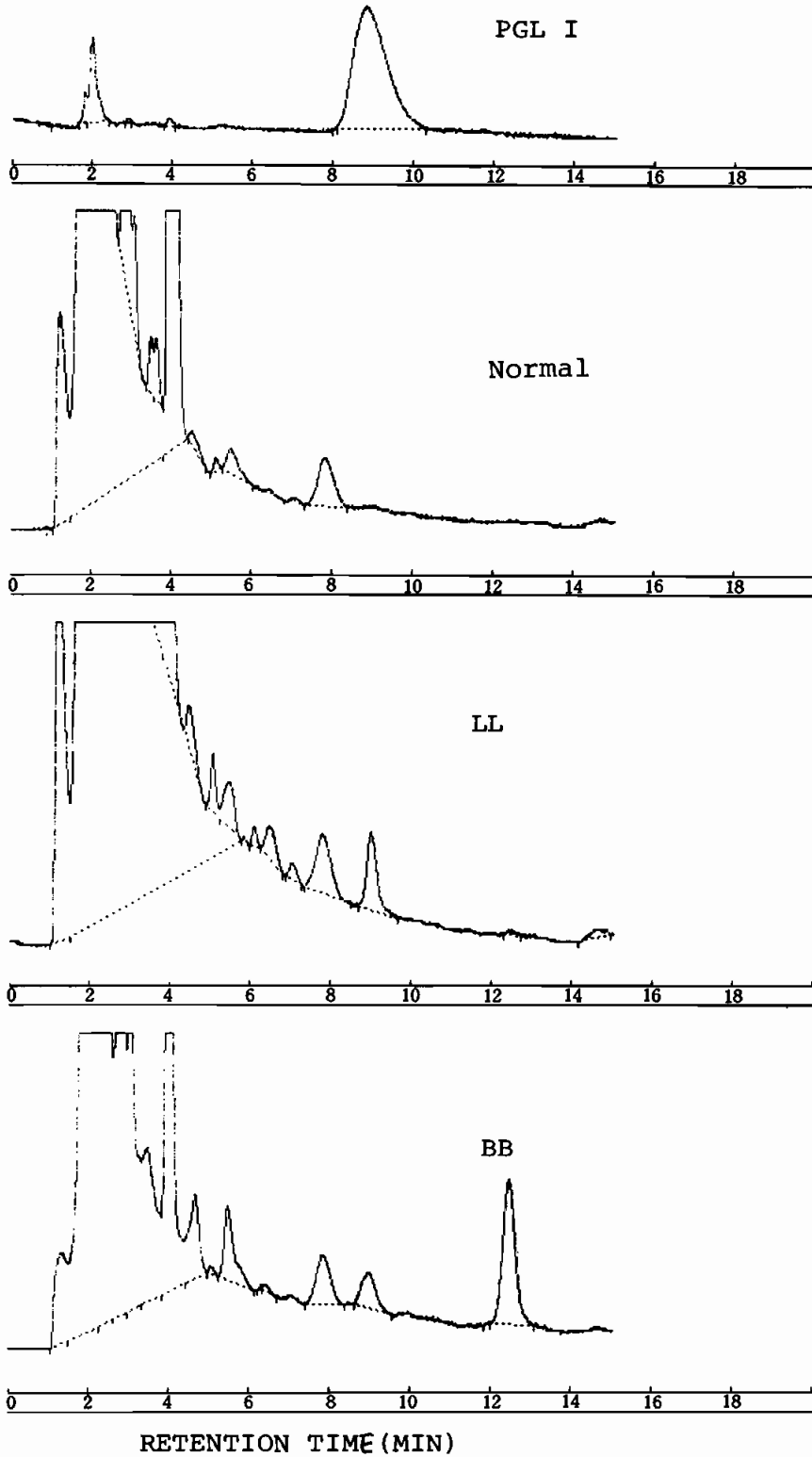


図-3 種々の血清から抽出したPGL-I画分のHPLC

表-2. 血清試料中のPGL-Iの定量

血清番号	病型	病勢	抗体(註1)	PGL-I ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	血清番号	病型	病勢	抗体(註1)	PGL-I ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
1	L	A	+	-	17	BB	I	+	-
2	L	A	+	2.61	18	BB	I	-	4.28
3	L	A	+	6.89					
4	L	I	-	0.71	19	BT	A	+	-
5	L	I	+	0.84	20	BT	I	+	3.39
6	L	I	-	-	21	BT	I	+	-
7	L	I	+	±	22	T	A	-	-
8	L	I	-	-	23	T	I	-	-
9	L	I	-	3.32	24	T	I	-	-
10	L	I	-	-	25	T	I	-	-
11	BL	A	+	0.90					
12	BL	A	+	-	26	FC		-	-
13	BL	A	+	0.67	27	HC		-	-
14	BL	A	+	-	28	HC		-	-
15	BL	I	+	7.82	29	HC		-	-
					30	HC		-	-
16	BB	A	+	4.07	31	HC		-	-

(註1) 和泉眞蔵博士の測定による。

FC: 家族健康接触者, HC: 健康接触者, A: 活動期, I: 静止期

IV. 謝辞

本研究を行なうに当たって貴重な多数の血清を分与され、また多くの有益な助言を下された国立多摩研究所の和泉眞蔵博士に深く感謝いたします。

文 献

1. S. W. Hunter, T. Fujiwara and P. J. Brennan, *J. Biol. Chem.*, **257**, 15072 (1982).
2. D. B. Young and T. M. Buchanan, *Science*, **221**, 1057 (1983).
3. S.-N. Cho, D. L. Yanagihara, S. W. Hunter, R. H. Gelber and P. J. Brennan, *Infect. Immun.*, **41**, 1077 (1983).
4. T. Fujiwara, S. W. Hunter, S.-N. Cho, G. O. Aspinall and P. J. Brennan, *Infect. Immun.*, **43**, 245 (1984).
5. S.-N. Cho, T. Fujiwara, S. W. Hunter, T. H. Rea, R. H. Gelber and P. J. Brennan, *J. Infect. Dis.*, **150**, 311 (1984).
6. T. Fujiwara, S. Izumi and P. J. Brennan, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2301 (1985).
7. T. Fujiwara and S. Izumi, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2539 (1987).

8. D. Chatterjee, J. T. Douglas, S.-N. Cho, T. H. Rea, R. H. Gelber, G. O. Aspinall and P. J. Brennan, *Glycoconj.*, **2**, 187 (1985).
9. R. Gigg, S. Payne and R. Connant, *J. Carbohydr. Chem.*, **2**, 207 (1983).
10. S. J. Brett, S. N. Payne, J. Gigg, P. Burgess and R. Gigg, *Clin. Exp. Immunol.*, **64**, 476 (1986).
11. S. Chanteau, J.-L. Cartel, J. Roux and M.-A. Bach, *J. Infect. Dis.*, **157**, 770 (1988).
12. 和泉真蔵, 藤原 剛, 皮膚科紀要 (京都大学), **83**, 141 (1988).
13. S. Izumi, T. Fujiwara, M. Ikeda, Y. Nishimura, K. Sugiyama and K. Kawatsu, *J. Clin. Microbiol.*, 1990, 印刷中.
14. 皆川文庫, 吉野勇次, 長尾英治, 平澤 博, 仲宗根保子, 昭和62年度日米医学協力計画報告書, 104 (1988).
15. S.-N. Cho, S. W. Hunter, R. H. Gelber, T. H. Rea and P. J. Brennan, *J. Infect. Dis.*, **153**, 560 (1986).
16. D. Young, J. P. Harnish, J. Knight and T. M. Buchanan, *J. Infect. Dis.*, **153**, 1078 (1986).
17. S. W. Hunter, C. Stewart and P. J. Brennan, *Int. J. Lep.*, **53**, 484 (1985).

Summary

Solid phase extraction of phenolic glycolipid I (PGL-I) of *Mycobacterium leprae* using Extrelute 1 column was tried in a combination with the quantitative analysis by HPLC. Sera (250 μ l) were diluted twice with 0.1M NaOH and charged to a Extrelute 1 column. The best recovery (about 42%) of PGL-I was achieved with 6ml of chloroform in case of the serum with 10 μ g/ml of PGL-I. However, recovery decreased in a large degree in the sera containing low concentrations of PGL-I (30% at 1 μ g/ml of PGL-I, 23% at 0.5 μ g/ml of PGL-I). The limit of quantitation was about 0.5 μ g/ml of PGL-I. This method was enough simple and useful for the quantitative analysis of large amount of sera.

Quantitative analysis of various types of leprosy sera showed that L and BL type leprosy sera have higher PGL-I positive rates than those of T and BT. However, only weak correlation was found between the positive rate of PGL-I and the presence of anti-PGL-I antibody.